

University of Groningen

Asymmetric fusion of Di-n-alkylphosphate vesicles

Fonteijn, Theodorus Adrianus Antonius

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1992

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Fonteijn, T. A. A. (1992). *Asymmetric fusion of Di-n-alkylphosphate vesicles*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Membraanfusie is een cruciaal proces in de natuur. Het vindt ontelbare malen plaats in elke cel bij celdeling, endocytose, exocytose en virusinfectie. De fuserende membranen komen in contact met elkaar en vormen een aggregaat, de daaropvolgende destabilisatie van dit intermediair leidt tot de uiteindelijke versmelting van de beide membranen. Omdat biologische membranen zeer complexe structuren bezitten en een grote variatie aan componenten herbergen, zijn veel studies betreffende membraanfusie uitgevoerd met relatief simpele modelsystemen. Met name vesicles (liposomen) van fosfolipiden (die de matrix van de veel complexere biomembranen vormen) zijn hiervoor veel gebruikt. Deze vesicles bestaan uit een gesloten bilaag van fosfolipiden die een compartiment gevuld met water omsluit. Deze "blaasjes" vertonen dus een zekere gelijkenis met biologische membranen.

Synthetische surfactanten zijn ook in staat om vesicles te vormen en hebben recentelijk blijk gegeven ook te kunnen fuseren. Deze synthetische amfifielen bieden de mogelijkheid tot nagenoeg oneindige structuurvariaties. Deze mogelijkheid is bij de fosfolipiden minder groot. Vandaar dat met behulp van synthetische amfifielen structuureffecten op de membraaneigenschappen (waaronder fusie) goed te bestuderen zijn.

Tot dusver hebben studies van vesicelfusie, zowel voor de liposomale als voor de synthetische vesicle systemen, zich beperkt tot enkel fusie tussen vesicles van gelijke samenstelling ("symmetrische fusie"). Vesicles wordt een toekomstige rol als carriersysteem toegedacht voor het overbrengen van zowel wateroplosbare als lipofiele verbindingen (drugs) naar het cytoplasma of het membraan van cellen. De moleculaire samenstelling van deze carriervesicles zal nooit gelijk zijn aan die van het celmembraan. In dit licht bezien, is het verbazingwekkend dat nog amper is gekeken naar "asymmetrische fusie", d.w.z. de fusie tussen membranen van verschillende samenstelling.

In dit proefschrift is een eerste poging gedaan de effecten te bestuderen die een rol spelen bij asymmetrische fusie. Daartoe is allereerst gekeken naar de interacties van vesicles van synthetische amfifielen (dialkylfosfaten (DAP)) met liposomen. De resultaten tonen dat asymmetrische fusie inderdaad kan optreden. De dialkylfosfaat vesicles blijken interessante eigenschappen te bezitten die het mogelijk maken om systemen te bedenken waarbij exclusief asymmetrische fusie plaats vindt. In de loop van deze studie is gekeken of de goede eigenschappen van DAP ook tot hun recht komen tijdens interacties met membranen die complexer zijn dan liposomen en een grotere biologische relevantie moet worden toegekend: erythrocyte ghostmembranen (leeggehaalde rode bloedcellen) en virale membranen (Sendai virus). Het blijkt dat symmetrische fusie van DAP vesicles een negatief effect heeft op het optreden van asymmetrische fusie. Vandaar dat tot slot de rol van symmetrische DAP fusie en de mogelijkheid tot het regenereren van DAP vesicles uit symmetrische fusieproducten is bestudeerd. Tijdens deze experimenten is tevens gewerkt aan een aantal intrinsieke problemen die kleven aan het werken met vesicles van synthetische amfifielen onder fysiologische condities (vesiclelabiliteit, lekkage).

Samenvattend mag worden gezegd dat vesicles van synthetische amfifielen betere asymmetrische fusie eigenschappen bezitten dan vesicles van phospholipiden (PS). DAP vesicles hebben in deze studie laten zien (een drug concentrerend vermogen, hoge intrinsieke fusie capaciteit, de mogelijkheid tot exclusive asymmetrische fusie) waarom zij aanspraak te maken op het predicaat "veelbelovend" met betrekking tot hun gebruik als (lipofiele) carriersystemen. Het is niet ondenkbaar, dat de in dit proefschrift beschreven systemen (synthetische amfifielen in de vorm van vesicles) een grotere toepasbaarheid bezitten; hun activiteit als carrier hoeft niet altijd gebaseerd te zijn op overdracht van materiaal volgens een "klassiek" membraanfusie mechanisme.

Hoofdstuk 1 geeft een samenvatting van een aantal belangrijke inzichten die verkregen zijn wat betreft het gedrag van biomembranen. De complexe structuur van biomembranen wordt beschreven, net als de mogelijke fase-overgangen die deze bilagen kunnen ondergaan. In dit hoofdstuk passeren verschillende modelsystemen voor biomembranen de revue en worden de factoren die bij de associatie van amfifielen tot bilagen een rol spelen kort besproken. Tenslotte volgt een korte samenvatting van de kenmerken van symmetrische membraanfusie en wordt ingegaan op de manieren waarop membraan fusie bewerkstelligd kan worden.

Hoofdstuk 2 beschrijft een studie naar de mogelijkheid om negatief geladen dialkylfosfaat (DAP) vesicles te fuseren met zowel negatieve als ongeladen phospholipid vesicles (fosfatidylserine, PS; resp. dioleoylfosfatidylcholine, DOPC). Er blijkt inderdaad asymmetrische fusie op te treden, zoals kan worden gevolgd met een techniek die de uitverduunning meet van twee verschillende fluorescerende verbindingen (de RET-methode). Verrassend is dat de DAP vesicles kunnen fuseren terwijl ze zich in de zgn. gel-toestand bevinden. Phospholipid vesicles zijn over het algemeen niet in staat om te fuseren in deze fase, waarin de moleculen in de bilaag relatief weinig beweeglijk zijn. DAP vesicles kunnen fuseren met een zowel negatief geladen (PS) als neutrale vesicles (DOPC), zolang deze "targetmembranen" in de vloeibaar-kristallijne fase zijn, dus bij temperaturen boven de betreffende faseovergangstemperatuur, T_c . Wanneer zowel het targetmembraan als het DAP membraan zich in de gel fase bevinden treedt geen fusie op.

Ca^{2+} ionen zijn nodig om fusie tussen PS vesicles en DAP vesicles te induceren. Echter, spontane fusie treedt op tussen neutrale DOPC vesicles en DAP vesicles. Niettemin heeft ook deze asymmetrische fusie baat bij de aanwezigheid van Ca^{2+} .

Met een simpele kinetische analyse is de asymmetrische aggregatie van een mengsel van twee verschillende vesiclepreparaten te beschrijven. Uit experimentale aggregatiemetingen (turbiditeitsmetingen), zijn de asymmetrische aggregatiesnelheden te bepalen. Door de kinetische gegevens van de RET assay te combineren met de aggregatiesnelheden, blijkt dat het samensmelten van de membranen de snelheidsbepalende stap in het gehele asymmetrische fusieproces is.

M.b.v. electronenmicroscopie wordt gevonden dat asymmetrische fusie met fosfolipid vesicles de bilaag structuur van DAP vesicles stabiliseert. Asymmetrische fusie onderdrukt de vorming van symmetrische DAP fusieprodukten. De fusieprodukten laten zich scheiden op sucrosegradienten en zijn daardoor afzonderlijk te analyseren. Tijdens asymmetrische PS-DDP fusie blijken er nauwelijks volledig symmetrische

fusie-produkten te ontstaan. Uit de RET-methode blijkt dat de samenstelling van het in hoofdzaak gevormde asymmetrische fusieprodukt, gelijk is aan de verhouding waarin de twee vesicle populaties (DDP en PS) zijn gemengd voordat asymmetrische fusie werd geïnduceerd met Ca^{2+} .

In feite is in dit hoofdstuk al voldaan aan een van de doelstellingen, namelijk het verkrijgen van een specifiek asymmetrisch fuserend systeem. De fusie tussen DDP en DOPC vesicles beneden de T_c van DDP (29°C), staat garant voor exclusieve asymmetrische fusie. Deze bijzondere eigenschap van DAP vesicles stelt ons in staat om nog meer exclusief asymmetrisch fuserende systemen te ontwikkelen.

In hoofdstuk 3 worden de interacties tussen didodecylfosfaat vesicles en erythrocyte ghostmembranen (leeggehaalde rode bloedlichaampjes) beschreven. De DDP vesicles blijken ook met de veel complexere ghosts te fuseren. Opnieuw vindt er exclusief asymmetrische fusie plaats tussen beide membranen beneden de T_c van DDP. Bij deze temperaturen treedt asymmetrische DDP-ghost fusie veel sneller en in hogere mate op dan asymmetrische fusie van PS liposomen met de ghost membranen. Dit is waarschijnlijk te danken aan de afwezigheid van een symmetrische fusie reactie onder de DDP vesicles, terwijl de PS vesicles (die een T_c van ca. 7°C hebben) wel symmetrisch fuseren en daardoor hun neiging om verder te fuseren met de ghost membraan verliezen. Fusie vindt plaats onder invloed van Ca^{2+} -ionen maar er is ook een spontaan proces dat resulteert in het samensmelten van de membranen. De invloed van de eiwitten van de ghostmembraan op de asymmetrische fusie is onderzocht met behulp van proteolytische enzymen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de lotgevallen van DDP vesicles wanneer zij in aanraking komen met een zeer fusogeen biomembraan, dat van een virus (Sendai (HVJ)). Virale membranen bezitten eiwitten die geëvolueerd zijn om zeer efficiënt te hechten aan en vervolgens te fuseren met celmembranen (infecteren). Deze fusie wordt dus geïnduceerd door deze proteïnen. Het blijkt dat Sendai virusdeeltjes ook met DDP vesicles kunnen fuseren; Ca^{2+} is daarbij overbodig. De kinetiek van deze asymmetrische Sendai-DDP fusie kan beschreven en voorspeld worden met een "mass action" kinetisch model. De virale eiwitten blijken een specifieke interactie met de DDP membranen aan te gaan en gedragen zich anders dan wanneer ze fuseren met biologische membranen.

Electronenmicroscopie laat zien dat fusie resulteert in grote bolvormige fusieproducten met een diameter van ca. 1000 nm. Net als in de voorafgaande hoofdstukken is het effect van de temperatuur op de fusie bekeken. Fusie treedt op zowel boven als onder de T_c van DDP. De mobiliteit van de virale fusie-eiwitten lijkt echter van groter belang te zijn voor het optreden van fusie dan de toestand van de DDP membraan zelf. Eiwitpenetratie van hydrofobe delen van de virale fusie-proteïnen in de DDP bilaag zorgt waarschijnlijk voor de destabilisatie van het membraansysteem waarna fusie volgt. Verlaging van de pH leidt tot een verbeterde fusieactiviteit. Dit is zowel te verklaren als een effect op de hydrofobiciteit van de virale membraaneiwitten als een verandering in de fosfaatkopgroep interacties mogelijk resulterend in een betere toegankelijkheid van het DDP membraan voor de hydrofobe eiwit delen.

In hoofdstuk 5 worden de stabiliteitsproblemen van de DAP vesicles nader onderzocht. Deze vesicles zijn instabiel bij hoge (fysiologische) ionsterkte en vertonen ook sterke lekkage wanneer materiaal wordt ingesloten in het waterige compartiment. Het

maken van gemengde DAP/cholesterol vesicles leidt tot een verminderde lekkage, en ook tot een sterk verbeterde zoutstabiliteit. Dit laatste geldt echter ook voor DDP/DOPC vesicles. Een gemengde DAP/DOPC/cholesterol vesicle zou deze goede eigenschappen in zich kunnen verenigen, maar heeft als nadeel dat de fusogene activiteit sterk gereduceerd zal zijn (DOPC en cholesterol zijn niet fusogeen o.i.v. Ca^{2+} ionen). Naast het mengen van de bilagen (lipiden), is een kenmerk van membraanfusie ook de menging van de waterige inhoud van de vesicles. Ondanks de verbeterde stabiliteit van de gemengde DAP vesicles, bleef deze onvoldoende om de menging van de waterige inhoud van de vesicles tijdens het fusieproces te kunnen aantonen.

DDP vesicles die gemaakt zijn in een waterige oplossing van naproxen (een pijnstillertje), hebben ondanks de aanwezigheid van ca. 15 mole % naproxen moleculen in of aan de bilag, praktisch dezelfde asymmetrische fusiecapaciteit als gewone DDP vesicles. Dit biedt goede perspectieven om de DAP vesicles te gaan gebruiken als carriers voor lipofiele moleculen.

Het optreden van symmetrische fusie tijdens een experiment waarin asymmetrische fusie moet worden bewerkstelligd lijkt ongunstig te zijn. Na symmetrische fusie zijn de gevormde producten over het algemeen minder geneigd verder te fuseren. Dit is met name het geval voor DAP vesicles; de symmetrische fusieproducten (grote vesicles) transformeren zich tot fusogeen inactieve lamellaire $\text{Ca}(\text{DAP})_2$ kristallen. In hoofdstuk 6 wordt aandacht besteed aan de vorming van deze kristallen. Uit deze kristallen bleken opnieuw vesicles te ontstaan wanneer Ca^{2+} bindend Na_2EDTA aan de kristallen wordt toegevoegd. De Ca^{2+} ionen in de kristallijne fase wordt nagenoeg volledig vervangen door Na^+ ionen.

Er blijkt een complex fasegedrag ten grondslag te liggen aan de vorming van vesicles uit deze, in water, vloeibaar kristallijne NaDDP fase. De vorming van myelinestructuren uit de deze fase blijkt van cruciaal belang te zijn voor de formatie van vesicles. De aard van het tegenion van de DAP amfifielen in de in water gevormde lyotrope kristallijne fase, bepaalt in grote mate het gemak waarmee de myeline structuren, en daarmee de vesicles, gevormd worden.

Het verkregen fasendiagram suggereert een mogelijke regeneratie van vesicles uit de symmetrische DAP fusieproducten. Na hernieuwd toevoegen van Ca^{2+} zou dit kunnen leiden tot een stapsgewijze toename van de opbrengst aan asymmetrische fusieproducten.

In hoofdstuk 7 wordt de perspectieven van de bestudeerde vesicle systemen kritisch geëvalueerd. Het slechte insluitingsgedrag van wateroplosbare moleculen in de DAP vesicles impliceert dat DAP vesicles minder geschikt zijn als carrier voor dit soort verbindingen. Door hun hoge intrinsieke fusie capaciteit (die gehandhaafd blijft ondanks de aanwezigheid van bijv. naproxen in of aan de bilag), is er voor DAP vesicles in de toekomst mogelijk wel een rol weggelegd als *lipofiele* carrier. In dit hoofdstuk wordt ook duidelijk dat de toepassingen van synthetische amfifielen niet alleen afhankelijk zijn van de mogelijkheid van vesicles om te fuseren (transfectie, cytoprotectie, immunorepressie).